

Arkadiusz TELESIŃSKI, Maciej PŁATKOWSKI

## OCENA UBOCZNEGO ODDZIAŁYWANIA SPINOSADU NA AKTYWNOŚĆ OKSYDAZY o-DIFENOLOWEJ W GLEBIE

### ASSESSMENT OF SPINOSAD SIDE-EFFECT ON o-DIPHENOL OXIDASE ACTIVITY IN SOIL

Zakład Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie  
ul. Juliusza Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, e-mail: arkadiusz.telesinski@zut.edu.pl

**Abstract.** Into the loamy sand and sandy loam introduced the insecticide Spintor 240 SC, containing active substance spinosad, in the field dose, 5, 10 and 25 times larger. After treatment soil of spinosad o-diphenol oxidase activity was significant changed, but effect of spinosad was not connected with dose of insecticide. Effect of spinosad depended on soil properties: in loamy sand induced stimulation, but in sandy loam induced inhibition of o-diphenol activity.

**Słowa kluczowe:** gleba, oksydaza o-difenolowa, spinosad.

**Key words:** o-diphenol oxidase, soil, spinosad.

#### WSTĘP

System rolnictwa ekologicznego wymaga przestrzegania ściśle określonych zasad produkcji roślinnej i zwierzęcej, w tym używania tzw. ekologicznych pestycydów (Kowalska i Kühne 2009). Do grupy tej zaliczany jest spinosad, którego stosowanie stwarza znacznie większe możliwości ochrony upraw, gdyż związek ten charakteryzuje się szerokim spektrum podatnych na niego owadów (Drożdżyński i in. 2010). Ze względu na budowę chemiczną spinosad jest zaliczany do makrocyclicznych laktonów. W skład spinosadu wchodzi dwa metabolity makrocycliczne spinosyn A –  $C_{41}H_{65}NO_{10}$  oraz spinosyn D –  $C_{42}H_{67}NO_{10}$  (Sikorska i Wędzisz 2009). Substancja ta otrzymywana jest w wyniku fermentacji drobnoustrojów *Saccharopolyspora spinosa* (*Actinomycetes*), pozyskiwanych z organizmów zasiedlających glebę (Mertz i Yao 1990).

Jednak praktycznie każdy pestycyd, nawet zastosowany nalistnie, dociera do gleby, która stanowi główny rezerwuár kumulujący pozostałości pestycydów (Adamczewski i Banaszak 2000). W glebie środki ochrony roślin podlegają różnym przemianom. Zdolność do degradacji aromatycznych zanieczyszczeń gleby, w tym pozostałości pestycydów wykazują oksydazy polifenolowe (Simmons i in. 1989). Enzymy te przekształcają pestycydy do form, które spontanicznie łączą się lub wbudowują kowalencyjnie w strukturę kwasów humusowych, przez co stają się biologicznie niedostępne, więc teoretycznie nie są toksyczne dla środowiska (Park i in. 2002).

Celem podjętych badań było określenie oddziaływania pozostałości spinosadu na aktywność oksydazy o-difenolowej w glebie oraz określenie rodzaju zmian w zależności od wielkości dawki spinosadu oraz typu gleby.

## MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych na dwóch glebach pobranych z poziomu ornopróchnicznego (0–30 cm) gleb brunatno-rdzawych RZD w Lipniku oraz czarnych ziem Równiny Gumienieckiej (Ostoja). Charakterystykę użytych w doświadczeniu gleb przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka gleb użytych w doświadczeniu  
Table 1. Characteristics of soils used in experiment

Właściwości Propeties	Lipnik	Ostoja
Frakcje granulometryczne Granulometric fractions		
1,0–0,1 mm	64%	43%
0,1–0,02 mm	22%	30%
< 0,02 mm	14%	27%
Grupa granulometryczna Granulometric group	pg	gl
Materia organiczna Organic matter [%]	3,697	4,959
C <sub>org</sub> [%]	0,872	1,095
N <sub>t</sub> [%]	0,039	0,248
C:N	22,5:1	4,5:1
pH w – pH in:		
H <sub>2</sub> O	6,588	7,094
1 M KCl	6,359	6,807

Pobraną z pola glebę przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm. Do części ziemistych przygotowanego materiału glebowego wprowadzono wodne emulsje produkowanego przez firmę Dow AgroSciences Polska Sp. z o.o. insektycydu Spintor 240 SC (s.a. 240 g spinosadu w 1 dm<sup>3</sup> preparatu) w następujących dawkach:

- połowa – zalecana przez producenta (1D),
- pięciokrotnie większa od zalecanej (5D),
- dziesięciokrotnie większa od zalecanej (10D),
- dwudziestopięciokrotnie większa od zalecanej (25D).

Poszczególne dawki preparatu przeliczono na 1 kg gleby, biorąc pod uwagę warstwę gleby 10 cm. Odniesieniem była gleba bez dodatku pestycydu. Próbki glebowe podzielono na 1-kilogramowe naważki. Następnie doprowadzono wilgotność gleb do 60-procentowej kapilarnej pojemności wodnej. Glebę dokładnie wymieszano i przechowywano w szczelnie zamkniętych workach polietylenowych w temperaturze 20°C. W 1., 7., 14. i 28. dniu doświadczenia w próbkach glebowych, w czterech powtórzeniach, oznaczono spektrofotometrycznie aktywność oksydazy o-difenolowej metodą Perruciego i in. (2000). W oznaczeniach wykorzystano spektrofotometr UV-1800, firmy Shimadzu. Absorbancję zmierzono przy długości fali  $\lambda = 525$  nm wobec próby odczynnikowej (próba bez dodatku gleby). Aktywność oksydazy o-difenolowej podano w  $\mu\text{mol utlenionego katecholu} \cdot (\text{g s.m. gleby} \cdot 10 \text{ min})^{-1}$ .

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji. Czynnikiem pierwszym była dawka spinosadu, a drugim typ gleby. Analizy wykonano niezależnie dla każdego terminu pomiaru. Najmniejsze istotne różnice obliczono według procedury Tukeya przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## WYNIKI I DISKUSJA

Otrzymane wyniki badań zestawiono w tabeli 2 oraz na rysunkach 1–2. W tabeli 2 przedstawiono wartości rzeczywiste aktywności oksydazy o-difenolowej (o-DPO) w glebie. Wartości te przeliczono następnie w stosunku do aktywności enzymu w glebie kontrolnej (przyjmując ją za 100%) i przedstawiono jako procent kontroli (rys. 1). Obliczono również średnią procentową aktywność enzymu ze wszystkich terminów pomiarów w glebie zanieczyszczonej różnymi dawkami spinosadu i zobrazowano ją na rysunku 2. Na tym wykresie wyniki podane są w układzie półlogarytmicznym – na osi odciętych w skali logarytmicznej wielokrotność dawki spinosadu, a na osi rzędnych – średnia procentowa aktywność enzymu.

Tabela 2. Aktywność oksydazy o-difenolowej w glebach zanieczyszczonych spinosadem  
Table 2. Activity of o-diphenol oxidase in soils contaminated with spinosad

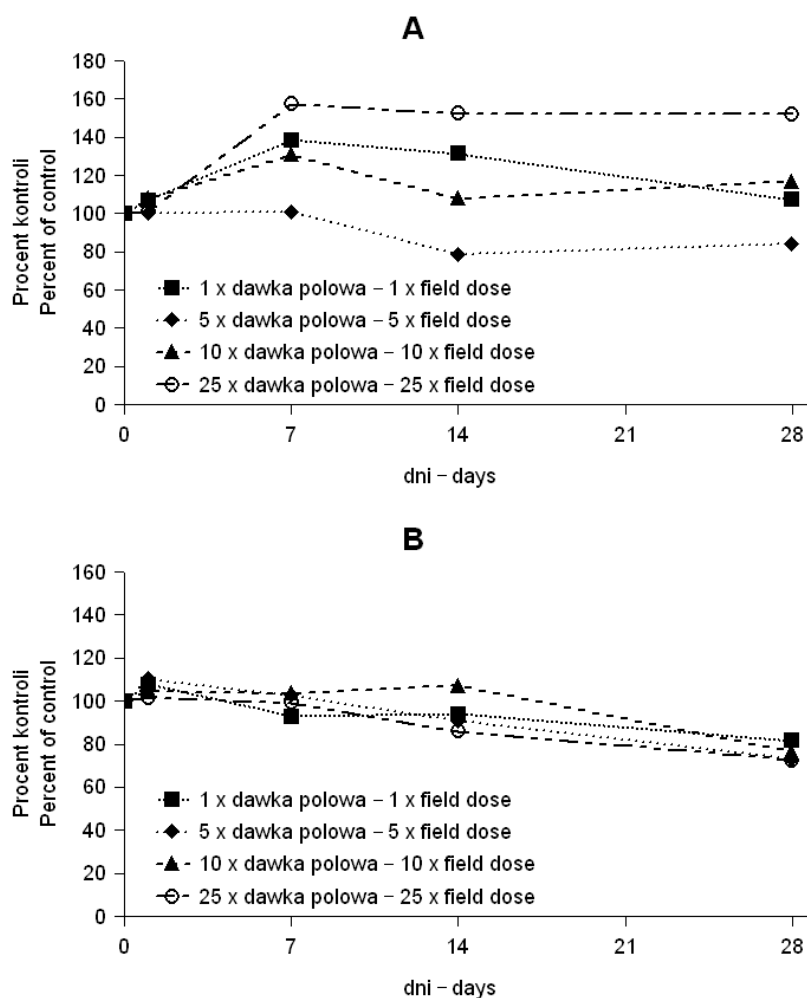
Gleba Soil (A)	Dawka spinosadu – Spinosad dose (B)					$\bar{x}$
	0	1D	5D	10D	25D	
1. dzień						
Lipnik	3,80	4,06	3,80	4,10	3,84	3,92
Ostoja	5,01	5,40	5,52	5,23	5,09	5,29
$\bar{x}$	4,41	4,73	4,66	4,67	4,47	4,59
NIR <sub>0,05</sub>			A = 0,192	B = ns		
LSD <sub>0,05</sub>			A × B = ns	B × A = ns		
7. dzień						
Lipnik	3,57	4,95	3,60	4,67	5,62	4,48
Ostoja	5,66	5,25	5,80	5,87	5,62	5,64
$\bar{x}$	4,62	5,10	4,70	5,27	5,62	5,06
NIR <sub>0,05</sub>			A = 0,134	B = 0,303		
LSD <sub>0,05</sub>			A × B = 0,429	B × A = 0,299		
14. dzień						
Lipnik	3,63	4,76	2,85	3,91	5,52	4,13
Ostoja	5,33	5,01	4,83	5,72	4,59	5,10
$\bar{x}$	4,48	4,89	3,84	4,81	5,06	4,62
NIR <sub>0,05</sub>			A = 0,216	B = 0,489		
LSD <sub>0,05</sub>			A × B = 0,692	B × A = 0,482		
28. dzień						
Lipnik	3,51	5,76	2,95	4,10	5,34	3,93
Ostoja	5,72	4,66	4,18	4,37	4,15	4,62
$\bar{x}$	4,61	4,26	3,57	4,23	4,75	4,27
NIR <sub>0,05</sub>			A = 0,137	B = 0,310		
LSD <sub>0,05</sub>			A × B = 0,439	B × A = 0,306		

Aktywność o-DPO w trakcie trwania doświadczenia w glebie z Lipnika (pg) niezanieczyszczonej spinosadem kształtowała się w przedziale od 3,508 do 3,801  $\mu\text{mol}$  utlenionego katecholu  $\cdot (\text{g s.m. gleby} \cdot 10 \text{ min})^{-1}$ , a w glebie z Ostoi (gl) 5,016 do 5,720  $\mu\text{mol}$  utlenionego katecholu  $\cdot (\text{g s.m. gleby} \cdot 10 \text{ min})^{-1}$ .

Zarówno w glebie z Lipnika, jak i z Ostoi, w pierwszym dniu doświadczenia po wprowadzeniu do gleby wszystkich dawek spinosadu nie występowały istotne zmiany aktywności badanego enzymu.

Wprowadzenie spinosadu w dawce polowej 10- i 25-krotnie większej do gleby z Lipnika po tygodniu trwania doświadczenia spowodowało istotne statystycznie podwyższenie aktywności o-DPO. Zaobserwowana stymulacja zwiększała się wraz ze stężeniem preparatu i przy dawce najwyższej wynosiła ponad 50% w stosunku do gleby kontrolnej (rys. 1A). W literaturze można również znaleźć doniesienia o aktywacji enzymów oksydoredukcyjnych w glebie pod wpływem różnych pestycydów. Tu (1992) wykazał, że herbicydy – haloksyfop oraz tridifan – powodują wzrost aktywności dehydrogenaz, sięgający nawet 800%, w porównaniu z glebą kontrolną. Niewielką stymulację aktywności dehydrogenaz, pod wpływem insektycydu – deltametryny zastosowanej w dawce polowej i dziesięciokrotnie większej – wykazali także Nowak i Kłódka (1998). Shiyin i in. (2004) donoszą o aktywacji katalazy glebowej pod wpływem insektycydu chlorpyrifos.

Wprowadzenie dawki pięciokrotnie większej od zalecanej od 14. dnia doświadczenia hamowało aktywność oksydazy o-difenolowej w glebie z Lipnika. Natomiast w glebie z Ostoi dodatek spinosadu we wszystkich dawkach spowodował, w przeważającej części doświadczenia, obniżenie aktywności oksydazy o-difenolowej, co szczególnie uwidoczniło się w ostatnim dniu doświadczenia, kiedy zaobserwowane osłabienie kształtowało się na poziomie 18–27% (rys. 1B).

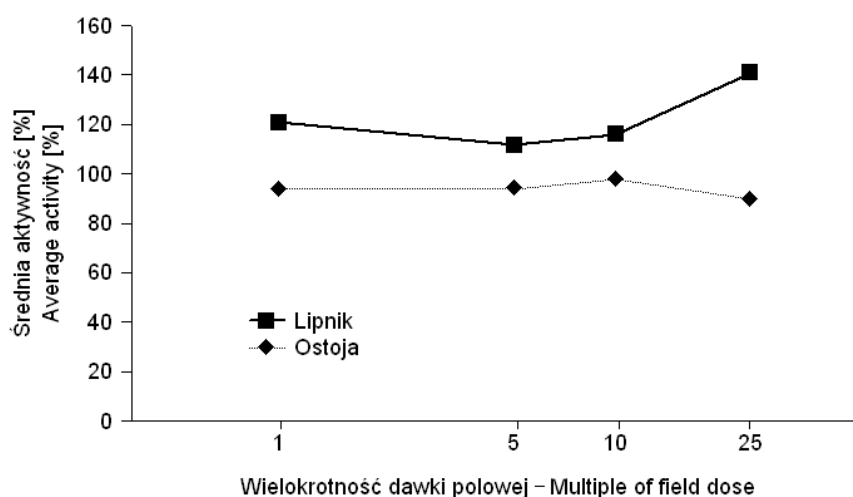


Rys. 1. Procentowe zmiany aktywności oksydazy o-difenolowej w glebach zanieczyszczonych spinosadem (A – Lipnik, B – Ostoja)

Fig. 1. Percentage changes of o-diphenol oxidase activity in soils contaminated with spinosad (A – Lipnik, B – Ostoja)

Spadek aktywności różnych enzymów oksydoredukcyjnych obserwowano również w glebach po wprowadzeniu do nich pestycydów: heksakonazolu, propikonazolu i profenofosu (Kalam i in. 2004) czy metolachloru (Zhou i in. 2005), a także fenwaleratu (Shiyin i in. 2004). Natomiast aktywność o-DPO może być hamowana przez metale ciężkie – Cd i Pb (Telesiński i in. 2011).

Biorąc pod uwagę średnią aktywność oksydazy o-difenolowej ze wszystkich terminów pomiarów zauważono, że dodatek spinosadu we wszystkich dawkach spowodował w glebie z Lipnika podwyższenie aktywności badanego enzymu, a w glebie z Ostoi jego obniżenie. W glebie z Lipnika po wprowadzeniu dawki połowej 5- i 10-krotnie większej obserwowana stymulacja kształtowała się na poziomie 12–20%. Dodatek spinosadu w dawce dwudziestopięciokrotnie większej od zalecanej spowodował podwyższenie średniej aktywności oksydazy o-difenolowej o 41%, w porównaniu z glebą kontrolną. Natomiast w glebie z Ostoi dodatek spinosadu spowodował obniżenie aktywności badanego enzymu, nie przekraczając przy wszystkich dawkach 10% (rys. 2).



Rys. 2. Średnia aktywność oksydazy o-difenolowej w glebach zanieczyszczonych spinosadem  
Fig. 2. Average activity of o-diphenol oxidase in soils contaminated with spinosad

## WNIOSKI

1. Aktywność oksydazy o-difenolowej w glebie ulega istotnym zmianom w wyniku zanieczyszczenia podłoża spinosadem.
2. Oddziaływanie pozostałości spinosadu na aktywność oksydazy o-difenolowej zależne jest od typu gleby. W glebie lekkiej (piasek gliniasty) wpływają one stymulująco, a w glebie cięższej (głina lekka) inhibitująco na aktywność enzymu.
3. Nie występuje wyraźna zależność pomiędzy wielkością dawki spinosadu a zmianami aktywności oksydazy o-difenolowej w glebie.

## PIŚMIENNICTWO

- Adamczewski K., Banaszak K.** 2000. Mechanizm zachowania się herbicydów w glebie. Ochr. Rośl. 11, 5–8.
- Drożdżyński D., Kowalska J., Remlein-Starosta D.** 2010. Badanie pozostałości spinosadu, azadyrachtyny i rotenonu w materiale roślinnym oraz w glebie z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody QuEChERS i oznaczenia techniką chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (UPLC-MS/MS). Progr. Plant Protect. 50 (4), 1888–1892.
- Kalam A., Tah J., Mukherjee A.K.** 2004. Pesticide effects on microbial population and soil enzyme activities during vermicomposting of agricultural waste. J. Environ. Biol. 25 (2), 201–208.
- Kowalska J., Kühne S.** 2009. Zwalczenie stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata* Say) z wykorzystaniem spinosadu na plantacjach ekologicznych. J. Res. Appl. Agric. Eng. 54 (3), 146–148.
- Mertz F.P., Yao R.C.** 1990. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. Int. J. System. Bacteriol. 40, 34–39.
- Nowak J., Kłódka D.** 1998. Wpływ insektycydu pyretroidowego – Decisu 2,5 EC na zmiany aktywności fosfatazy kwaśnej i zasadowej oraz dehydrogenazy w glebie. Chem. Inż. Ekol. 5 (11), 1025–1032.
- Park J.-W., Dec J., Kim J.-E., Bollag J.M.** 2000. Dehalogenation of xenobiotics as a consequence of binding to humic materials. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38, 405–410.
- Perucci R., Casucci C., Dumontet S.** 2000. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. Soil Biol. Biochem. 32, 1927–1933.
- Shiyin L., Lixiao N., Panying P., Cheng S., Liansheng W.** 2004. Effects of pesticides and their hydrolysates on catalase activity in soil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 77, 600–606.
- Sikorska K., Wędzisz A.** 2009. Nowoczesne pestycydy – spinosad. Bromat. Chem. Toksykol. 42 (2), 203–212.
- Simmons K.E., Minard R.D., Bollag J.-M.** 1989. Oxidative co-oligomerization of guaiacol and 4-chloroaniline. Environ. Sci. Technol. 23, 115–121.
- Telesiński A., Chruściel M., Szymczak J.** 2011. Aktywność oksydazy o-difenolowej w glebie zanieczyszczonej kadmem, ołowiem i miedzią. Ochr. Środ. Zas. Nat. 48, 216–222.
- Tu C.M.** 1992. Effect of three newer pesticides on microbial and enzymatic activities in soil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49, 695–709.
- Zhou Y., Liu W., Wang T.** 2005. Effect of pesticide metolachlor and s-metolachlor on soil microorganisms in aqisols of Southern China. I. Catalase activity. Chin. J. Appl. Ecol. 15 (5), 895–898.